

AD

008934446

WPI Acc No: 1992-061715/199208

XRAM Acc No: C92-028245

Thermophilic bacteria derived ribonuclease H prepn. - by recombinant DNA technique

Patent Assignee: TANPAKU KOGAKU KENK (TANP-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 4008294	A	19920113				199208 B

Priority Applications (No Type Date): JP 90111065 A 19900426

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 2533671	B2		8		Previous Publ. patent JP 4008294

Abstract (Basic): JP 4008294 A

The following are new: (1) a recombinant expression vector which is aDNA fragment that encodes thermophilic bacteria derived ribonuclease H, and contains initiation codon converted from natural GTG to ATG under control of E. coli's gene expression system; (2) a transformant obtd. by transformation of host E. coli with an expression vector (1); and (3) prepn. of thermophilic ribonuclease H by culturing a transformant of (2) under suitable conditions for expression of thermophilic ribonuclease H, then recovering it from obtd. cells of E. coli.

The expression vector contains plasmid pBR322 derived replication origin, thermosensitive repressor clts857 gene, bacteriophage, lambdaPL, PR promoters and structural gene of thermophilic bacteria derived ribonuclease H under control of the PL, PR promoters, where the expression vector is pref. plasmid pJAL700T. The expression vector contains ampicillin resistant gene as a selective marker. The transformant is obtd. by transformation of host E. coli pref. K-12 strain HB101, which is E. coli HB10/pJAL700T.

USE/ADVANTAGE - The obtd. ribonuclease H, retains enzyme activity at 100% by treating at 90 deg.C., for 10 min.. Since, contaminated nuclease activity can be inactivated by heat treatment, highly purified enzyme can be obtd. efficiently and in high yield.

Dwg. 0/6

Title Terms: THERMOPHILIC; BACTERIA; DERIVATIVE; RIBONUCLEASE; PREPARATION; RECOMBINATION; DNA; TECHNIQUE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): C12N-001/21; C12N-009/22;

C12N-015/55; C12R-001/19

File Segment: CPI

?

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2533671号

(45) 発行日 平成 8 年(1996) 9 月11日

(24) 登録日 平成 8 年(1996) 6 月27日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
1/21		8828-4B	1/21	
9/22			9/22	
// (C 1 2 N 1/21			(C 1 2 N 1/21	
C 1 2 R 1:19)			C 1 2 R 1:19)	

請求項の数12(全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平2-111065

(22) 出願日 平成 2 年(1990) 4 月26日

(65) 公開番号 特開平4-8294

(43) 公開日 平成 4 年(1992) 1 月13日

微生物の受託番号 F E R M P - 1 1 4 1 6

(73) 特許権者 999999999

株式会社蛋白質工学研究所

大阪府吹田市古江台 6 丁目 2 番 3 号

(72) 発明者 金谷 茂則

大阪府吹田市山田西 1-25-A-710

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外 1 名)

審査官 村上 騎見高

(54) 【発明の名称】 組換えDNA技術による好熱菌リボヌクレアーゼHの製造法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 好熱菌リボヌクレアーゼHを暗号化しているDNA断片であって、開始コドン天然型のGTCからATGに変換したものを大腸菌の遺伝子発現系制御下に含有している組換え体発現ベクター。

【請求項 2】 プラスミドpBR322由来の複製起源、熱感受性リプレッサー $cI^{ts}$ の遺伝子、バクテリオファージラムダの $P_L$ 、 $P_R$ 両プロモーター、及び該 $P_L$ 、 $P_R$ 両プロモーターの支配下にある好熱菌リボヌクレアーゼHの構造遺伝子を含有しており、大腸菌内で複製及び発現可能な請求項 1 記載の発現ベクター。

【請求項 3】 プラスミドpJAL700Tである請求項 2 記載の発現ベクター。

【請求項 4】 選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を含有する請求項 3 記載の発現ベクター。

2

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれかに記載の発現ベクターで大腸菌宿主を形質転換することにより得られる形質転換体。

【請求項 6】 宿主が大腸菌K-12株HB101である請求項 5 記載の形質転換体。

【請求項 7】 大腸菌HB101/pJAL700Tである請求項 6 記載の形質転換体。

【請求項 8】 請求項 5～7 のいずれかに記載の形質転換体を好熱菌リボヌクレアーゼHの発現に適した条件下で培養し、得られた大腸菌菌体から好熱菌リボヌクレアーゼHを回収することからなる好熱菌リボヌクレアーゼHの製造方法。

【請求項 9】 大腸菌HB101/pJAL700Tの培養温度を対数増殖期に30℃から42℃に変えて培養することからなる請求項 8 記載の方法。

【請求項10】培養終了後、形質転換体の菌体を超音波処理して破砕し、得られた溶液をカラムクロマトグラフィーに付して、所望のタンパク質を単離することからなる請求項9記載の方法。

【請求項11】8M以上の濃度の尿素存在下、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーに付して、所望のタンパク質を精製した後、脱塩カラムにより尿素を除くことからなる請求項10記載の方法。

【請求項12】陽イオン交換樹脂としてホスフォセルロースを用いることからなる請求項11記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は、好熱菌リボヌクレアーゼHのDNA組換え法による製造に関し、さらに詳しくは、好熱菌リボヌクレアーゼH遺伝子を効率的に発現し得る発現ベクター、該発現ベクターを含有している形質転換体、および該形質転換体を用いて好熱菌リボヌクレアーゼHを製造する方法に関するものである。

【従来技術及び発明が解決しようとする課題】

リボヌクレアーゼHは、DNA・RNAハイブリッドのRNA鎖のみを特異的にエンド作用で切断するという基質特異性を有する。そのような基質特異性に基づき、生化学分野で極めて高い利用価値を有している。とりわけ、近年その発達の著しい遺伝子工学において、下記の如き様々な作用を有する酵素として大腸菌由来のものが大いに利用されている。

- 1) cDNAのクローニングの際の鋳型mRNAの除去。
- 2) mRNAのポリA領域の除去。
- 3) RNAの断片化。

本酵素の重要性は遺伝子工学の発展に伴って益々増大しているが、大腸菌リボヌクレアーゼHの菌体における生産量は、天然の状態では培養1ℓあたり最高10μg程度と著しく低く、需要に対する供給量の不足は明白である。そこで、DNA組換え法を利用し、大腸菌を用いてクローン化酵素を生産する試みがなされ、そのようにして得られた製品が既に様々な製造業者によって市販化されている[例、ベセスダ・リサーチ・ラボラトリー(Bethesda Research Laboratory)、ファルマシア、および宝酒造]。本発明者らも、大腸菌リボヌクレアーゼHの高生産菌の開発に既に成功している(特開平01-202286号)。

ところで、リボヌクレアーゼHを前述したようなcDNAクローニングの際の試薬として用いる場合には、ヌクレアーゼ等の混入の全くない高純度精製標品が要求される。しかしながら、いかに大腸菌リボヌクレアーゼHの生産レベルをあげても、本酵素を大腸菌から精製する限り、極めて微量に存在するヌクレアーゼ等の混入を除去することは極めて困難である。たとえ、そのような混入の全くない高純度精製標品を調製できたとしても、酵素希釈液、反応溶液、さらには空気中から微量のヌクレ

アーゼが混入してしまえばそれまでである。しかし、もし、極めて熱に安定なリボヌクレアーゼHの調製が可能になれば、そのような混入ヌクレアーゼ活性等は、加熱処理により除去することが可能になるであろう。一般に好熱菌由来の酵素は、常温菌由来のものより $T_m$ 値(酵素活性が50%失われる時の温度)が30℃から40℃も高く、100℃で数分間処理しても失活しないことが知られている。従って、好熱菌リボヌクレアーゼHを遺伝子組換え手法により大腸菌で生産させることができれば、加熱処理により混入してくるヌクレアーゼ活性を除去できるので、その研究用試薬としての価値は著しく高まると期待される。この場合、好熱菌から直接酵素を精製しても意味のないことは、混入してくるヌクレアーゼも熱に安定であろうことから明白であろう。

さらには、DNA/RNAハイブリッドが、高次構造をとるためにリボヌクレアーゼHで切断されにくいというような場合にも、そのような構造をとりえないような高温で酵素を作用させることが可能であるという利点も、好熱菌リボヌクレアーゼHは有する。以上のような観点から、クローン化好熱菌リボヌクレアーゼHの調製法の開発が望まれていた。ところで、好熱菌リボヌクレアーゼHの構造遺伝子は、すでに三菱化成生命研：板谷光泰博士によってクローニングされ、そのDNA配列も決定されているが(第1図)、開始コドンがGTGであるため、このままでは大腸菌で発現させても発現効率が極めて悪いと予測される。なぜなら、開始コドンは一般にMetのATGであり、GTGがMetをコードする効率は極めて低いことが知られているからである。よって、クローン化好熱菌リボヌクレアーゼHを大腸菌で効率よく発現させるためには、開始コドンの改変等も必要であることが予測されていた。

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、大腸菌における好熱菌リボヌクレアーゼHの発現を目的として、好熱菌リボヌクレアーゼH遺伝子を効率良く発現させ得る発現ベクターを構築するために種々検討を加えた結果、バクテリオファージラムダの $P_L$ 及び $P_R$ プロモーター、および該プロモーターの支配下にある好熱菌リボヌクレアーゼHの構造遺伝子を含むプラスミドで形質転換された大腸菌宿主細胞が、本酵素を効率良く産生することを見出し、本発明を完成するに至った。なお、ここで、好熱菌リボヌクレアーゼHの構造遺伝子は、その開始コドンがGTGからATGに改変されている。

即ち、本発明は、開始コドンを改変した好熱菌リボヌクレアーゼHの構造遺伝子がバクテリオファージλの $P_L$ 及び $P_R$ プロモーターの支配下にある、大腸菌内で複製および発現可能な発現ベクターを提供するものである。

また本発明は、好熱菌リボヌクレアーゼHの製造方法であって、上記の発現ベクターで大腸菌宿主を形質転換し、得られた形質転換体を好熱菌のリボヌクレアーゼH

遺伝子の発現に適した条件下で培養し、各培養液中のリボヌクレアーゼHを単離精製することからなる方法を提供するものである。

また本発明は、本発明の発現ベクターを含有する形質転換体を提供するものである。

さらにまた本発明は、好熱菌リボヌクレアーゼHを培養液中から単離精製する方法であって、形質転換体の培養終了後、該培養液から集菌し、該菌を超音波処理して溶解し、得られた細胞ライセイトを、8M以上の尿素の存在下でP-11カラムクロマトグラフィーにかけるとして含む方法を提供するものである。

本発明の発現ベクター、プラスミドpJAL700Tは、三菱化成生命研：板谷光泰博士によって好熱菌染色体からクローニングされた好熱菌リボヌクレアーゼH（以下、本明細書中では単にリボヌクレアーゼHと称する）の構造遺伝子（*rnh*）（第1図）を含有しているプラスミドpRET4004-3B6Aを*rnh*の供給源として用いて以下の如くにして構築された（第2図参照）。

なお、好熱菌リボヌクレアーゼHのクローニングとDN A配列については、すでに板谷により発表されており（第61回日本生化学会）、プラスミドpRET4004-3B6Aは、板谷により提供されたものである。

プラスミドpJAL700Tの構築

プラスミドpRET4004-3B6Aの700bp MluI-HindIII断片を切り出して、NdeIサイトを含む29merの合成DNAオリゴマー（第3図参照）と共に、市販のプラスミドpUC19のEcoRI-HindIII部位に挿入し、プラスミドpUC700EHを得る。ここで、29merの合成DNAオリゴマーは、好熱菌リボヌクレアーゼHの開始コドンを含むが、合成オリゴマーにおいては、開始コドンが天然型のGTGからATGに改変されている。プラスミドpUC700EHのHindIII部位をSalI部位に変換した後、650bp NdeI-SalI断片を切り出し、市販の発現ベクターpJLA503のNdeI-SalI部位に挿入し、本発明の発現ベクターpJAL700Tを構築する。プラスミドpJAL700Tの制限酵素切断地図を第4図に示す。プラスミドpJAL700Tでは、バクテリオファージラムダの $P_L$ 及び $P_R$ プロモーターがその3'-下流の好熱菌*rnh*遺伝子を支配している。さらに本プラスミドは、熱感受性リプレッサー*cI<sup>ts</sup>*の遺伝子を含むため、どのような大腸菌宿主を本プラスミドで形質転換しようとも、好熱菌RNaseHの発現は、培養温度を30°Cから42°Cにシフトすることにより誘導される。

リボヌクレアーゼHの大腸菌内での発現

上記のプラスミドpJAL700Tを用いて大腸菌K-12株HB101（F<sup>-</sup>, hsd.S20（*r<sub>s</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>s</sub><sup>-</sup>*）、recA13、ara-14、proA2、lacY1、galK2、rpsL20（*Sm<sup>r</sup>*）、xy1-5、mt1-1、supE44、 $\lambda^{-}$ ）を形質転換する。この場合、前述したように形質転換する大腸菌宿主の種類は問わない。 $P_L$ プロモーターは、*cI*リプレッサーが安定である温度領域（32°C以下）では機能せず、不安定な温度領域（40°C以

上）で初めて機能するという特徴を有するので、アンピシリン耐性に基づいて選択した形質転換体、E.coli HB101/pJAL700Tを、対数増殖期に培養温度を30°Cから40°Cに上昇させて培養すると、該プロモーターが機能し、リボヌクレアーゼHの発現が誘導され、所望の酵素リボヌクレアーゼHが大量生産されることになる。

リボヌクレアーゼHの単離精製

本発明方法でのリボヌクレアーゼHの単離精製は下記の順序で行なわれる。

1) 超音波処理

2) P-11カラムクロマトグラフィー

3) P-11カラムによる再クロマトグラフィー

上記の如くにして得られた本発明のリボヌクレアーゼH高生産菌を集菌後、超音波処理に付し、菌体内のリボヌクレアーゼHを可溶化する。細胞ライセイトを遠心した後、遠心上清（粗抽出液）に、最終8~10Mの濃度となるように尿素を加え、P-11セルロースカラムクロマトグラフィーにかけることにより精製標品を得る。

〔発明の作用〕

本発明のベクターを含有する形質転換体を上記の如くにして培養し、得られた培養液から本発明方法に従って単離精製されたリボヌクレアーゼHは、90°Cで10分間処理しても酵素活性を100%保持するので、混入しているヌクレアーゼ活性等を加熱処理により除去することが可能である。従って、本発明によれば、極めて高純度であることを要求する遺伝子工学用の酵素を、効率良く、高収率で得ることができる。以下に実施例を挙げ、本発明をさらに詳しく説明する。

実施例1 プラスミドpJAL700Tの構築*rnh*遺伝子源としてpRET4004-3B6Aを用いた。このプラスミドpRET4004-3B6A（10 $\mu$ g）を100 $\mu$ lの反応溶液中、50ユニットずつのHindIIIとMluIにより37°Cで1時間消化した。次いで、消化物を1.5%アガロースゲル電気泳動にかけた。*rnh*遺伝子を含む700bp HindIII-MluI断片をエレクトロエリクション（電気溶出）によりアガロースゲルから抽出した後、DE-52カラムクロマトグラフィーにより精製した。エタノール沈殿により回収された700bp HindIII-EcoRI断片の量は約1 $\mu$ gであった。一方、プラスミドベクターpUC19（TOYOBO製）（2 $\mu$ g）を50 $\mu$ lの反応溶液中、10ユニットずつのHindIIIとEcoRIにより37°Cで1時間完全に消化した消化物を0.7%アガロースゲル電気泳動にかけ、2.7kb EcoRI-HindIII断片を700bp断片と同様に溶出・精製した。回収率はほぼ100%であった。

以上のようにして得られた700bp HindIII-MluI断片および2.7kb EcoRI-HindIII断片それぞれ0.1 $\mu$ gと、29mer合成DNAオリゴマー（第3図）0.01 $\mu$ gを混合し、20 $\mu$ lの反応溶液中、5ユニットのT4DNAリガーゼ（TOYOBO製）と共に16°Cで30分間反応させ、プラスミドの環化を行なった。次いで、環化したプラスミドで大腸菌JM10

9を形質転換し、形質転換体よりプラスミドpUC700EHを得た。

次いで、このpUC700EH (2  $\mu$ g) を20  $\mu$ l の反応溶液中、10ユニットのHindIIIにより37°Cで1時間完全に消化した。エタノール沈澱によりDNAを回収した後、20  $\mu$ l の反応溶液中、2ユニットのDNAポリメラーゼ(クレノウ)を加えて37°Cで30分間反応させた後、65°Cで10分間処理した。エタノール沈澱により回収したDNAを20  $\mu$ l の反応溶液中、1ユニットの大腸菌アルカリ性フォスファターゼを加えて37°Cで30分間処理した後、反応溶液を0.7%アガロースゲル電気泳動にかけた。3.5kb DNA断片を700bp HindIII-MluI断片と同様に溶出・精製した。DNAの回収量は約1  $\mu$ gであった。得られたDNA0.1  $\mu$ gをSalIリンカー(宝酒造製)0.01  $\mu$ gと混合(モル比1:50)し、20  $\mu$ l の反応溶液中、5ユニットのT4 DNAリガーゼを加えて16°Cで30分間処理した。このようにして環化したプラスミドで大腸菌JM109を形質転換し、形質転換体よりプラスミドpUC700ESを得た。

最後に、以下のようにして発現ベクターpJAL700Tを構築した。プラスミドpUC700ES (10  $\mu$ g) を100  $\mu$ l の反応溶液中、50ユニットのNdeIと50ユニットのSalIを用いて37°Cで1時間、完全消化した後、1.5%アガロースゲル電気泳動にかけた。650bp NdeI-SalI断片を切り出し、700bp HindIII-MluI断片の場合と同様に溶出・精製を行なった。エタノール沈澱により回収されたDNAの量は約1  $\mu$ gであった。

一方、プラスミドpJLA503(西独:Medac社より購入)5  $\mu$ gを100  $\mu$ l の反応溶液中、50ユニットのNdeIと50ユニットのSalIを用いて37°Cで1時間消化した後、0.7%アガロースゲル電気泳動にかけた。4.9kb NdeI-SalI断片を切り出し、700bp HindIII-MluI断片の場合と同様に溶出・精製を行なった。エタノール沈澱により回収されたDNAの量は約1  $\mu$ gであった。

以上のようにして得られた650bp NdeI-SalI断片0.1  $\mu$ gと4.9kb NdeI-SalI断片0.1  $\mu$ gを混合し、20  $\mu$ l の反応溶液中、5ユニットのT4 DNAリガーゼにより16°Cで30分間処理し、プラスミドを環化した。環化したプラスミドで大腸菌HB101を形質転換し、形質転換体よりプラスミドpJAL700Tを得た(第2図参照)。

上記のようにして得た、所望のプラスミドpJAL700Tの詳細な制限酵素切断地図を第4図に示した。形質転換体エシェリシア・コリ(*E. coli*) HB101/pJAL700Tは、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(微工研菌寄第11416号、寄託日:平成2年4月18日)。

実施例2 形質転換体の培養とリボヌクレアーゼH含有菌体の調製

実施例1記載のプラスミドpJAL700Tで形質転換した大腸菌K-12株HB101(フェノタイプは前述)を80  $\mu$ g/lアンピシリンを含むLB培地中、30°Cで振盪培養した。培養液の濁度がクレット値で100前後まで生育した時点で培

養温度を42°Cに上げ、更に4時間振盪を続けた後、集菌した。得た菌体を-20°Cで凍結保存した。

実施例3 形質転換体からのリボヌクレアーゼHの抽出及び精製

実施例2で得た40mlの培養液から集めたHB101/pJAL700T菌体約300mgを、1mM EDTAを含む10mM トリス塩酸緩衝液(pH7.5)、5mlに懸濁した後、超音波処理により菌体を破砕した。次いで、15,000rpmで30分間遠心した。得られた遠心上清約5mlに、3.5gの尿素と120  $\mu$ l の1M酢酸緩衝液(pH5.5)を加えた。この時の、遠心上清中の尿素と、酢酸緩衝液の最終濃度は、それぞれ、約9M及び約20mMである。上記の操作で、菌体内のリボヌクレアーゼHは、ほぼ80%可溶化された。

次いで、8M尿素を含む20mM酢酸緩衝液(pH5.5)(以下、緩衝液Aと略称する)で平衡化したP-11カラム(0.6ml)に、上記試料液を適用した。試料の適用終了後、約2mlの緩衝液A及び2mlの0.2M NaClを含む緩衝液Aでこの順序にカラムを洗浄した後、NaCl濃度を0.7Mまで直線的に上昇させることにより、酵素を溶出した。P-11カラムクロマトグラフィーにおけるリボヌクレアーゼHの回収率は約50%であり、精製純度は約20%から95%に上昇した。P-11カラムからの溶出画分を、緩衝液Aで3倍希釈した後、同緩衝液で平衡化したP-11カラム(0.5ml)に再度適用するという、いわゆる再カラムクロマトグラフィーを行うことにより、リボヌクレアーゼHをSDS-PAGEで単一バンドが示されるまでに精製した(第5図)。このP-11による再クロマトグラフィーにおける本酵素の回収率は約80%であった。従って、全精製過程を通してのリボヌクレアーゼHの精製収率は約40%となる。精製標品からの8M尿素の除去は、10mM酢酸緩衝液(pH5.5)で平衡化したPD-10(ファルマシア)で脱塩することにより行った。本脱塩操作におけるリボヌクレアーゼHの回収は、ほぼ100%であった。結局、精製標品の収量は約10mg/lであった。このようにして得られた好熱菌リボヌクレアーゼHの、ML3・DNA/RNAハイブリッド加水分解に対する比活性は、37°Cで測定した場合、約10,000ユニット/mgと、大腸菌リボヌクレアーゼHの約8%であった。

実施例4 好熱菌リボヌクレアーゼHの熱安定性

実施例3で得られた好熱菌リボヌクレアーゼHの熱安定性を、大腸菌リボヌクレアーゼHと比較したところ、第6図に示すように、大腸菌リボヌクレアーゼHの酵素活性が、60°Cで10分間処理することによりほぼ完全に失活するのに対し、好熱菌リボヌクレアーゼHの酵素活性は、90°Cで10分間処理しても、全く影響を受けなかった。

[発明の効果]

リボヌクレアーゼHは、前述の如く試薬として価値の高い酵素である。これまで、クローン化大腸菌リボヌクレアーゼHが市販されているが、微量のヌクレアーゼ活

性等の混入を除去しきれないという問題があった。本発明は、熱処理により混入するヌクレアーゼ活性を除去することが可能な、クローン化好熱菌リボヌクレアーゼHの調製法を提供するものであり、該酵素を利用する研究の発展を促すものである。

【図面の簡単な説明】

第1図は好熱菌リボヌクレアーゼHの構造遺伝子のDNA配列と、DNA配列から予測されるアミノ酸配列を示す模

式図、第2図はプラスミドpJAL700Tの組立て模式図、第3図は合成DNAリンカー（29mer）の配列及び制限酵素部位を示す模式図、第4図はプラスミドpJAL700Tの制限酵素切断地図、第5図はSDS-PAGE後CBB染色した結果の写真の模式図、第6図は不可逆的な熱失活に対する安定性を好熱菌と大腸菌のリボヌクレアーゼH間で比較したグラフである。

【第1図】

MluI

CGGTGAACCCCTCCCCAGGAACGCGTGGCCCTCTTACCCGACGGGGCCTGCCCTGGGAAACCCCGGGCCC  
 ValAsnProSerProArgLysArgValAlaLeuPheThrAspGlyAlaCysLeuGlyAsnProGlyPro  
 (Met)

GGGGGTGGCGGCCCTCCCTCCGCTTCCACGCCACGAGAAGCTCCTCTCCGGGGAGAGGCCTGCACC  
 GlyGlyTrpAlaAlaLeuLeuArgPheHisAlaHisGluLysLeuLeuSerGlyGlyGluAlaCysThr

ACCAACAACCGCATGGAGCTCAAGGCGCCATAGAGCCTAAAGCCCTCAAGGAGCCTTCCGAGTTGGACCTC  
 ThrAsnAsnArgMetGluLeuLysAlaAlaIleGluProLysGlyLeuLysGluProCysGluLeuAspLeu

TACACCGACAGCCACTACCTCAAGAAGGCCTTCAACGAGGGCTGGCTGGAAGGCTGGCGGAAAAGGGGC  
 TyrThrAspSerHisTyrLeuLysLysAlaPheThrGluGlyTrpLeuGluGlyTrpArgLysArgGly

TGGCGGACGGCGGAGGGCAAGCCCGTGAAAAACCGCGACCTCTGGGAGGCCCTCCTCCTCGCCATGGCC  
 TrpArgThrAlaGluGlyLysProValLysAsnArgAspLeuTrpGluAlaLeuLeuAlaMetAla

CCCACGGTGGCCTTCCACTTCGTGAAGGGGCACAGGGCCACCCGGAGAACGAACGGGTGGACCGGGAGCGG  
 ProThrValArgPheHisPheValLysGlyHisThrGlyHisProGluAsnGluArgValAspArgGluAla

AGGCGCCAGGCCAGTCCAGGCCAAAAACGCCCTGCCCGCCCGGGCCCCACGCTTTTTCACGAAGAG  
 ArgArgGlnAlaGlnSerGlnAlaLysThrProCysProProArgAlaProThrLeuPheHisGluGlu

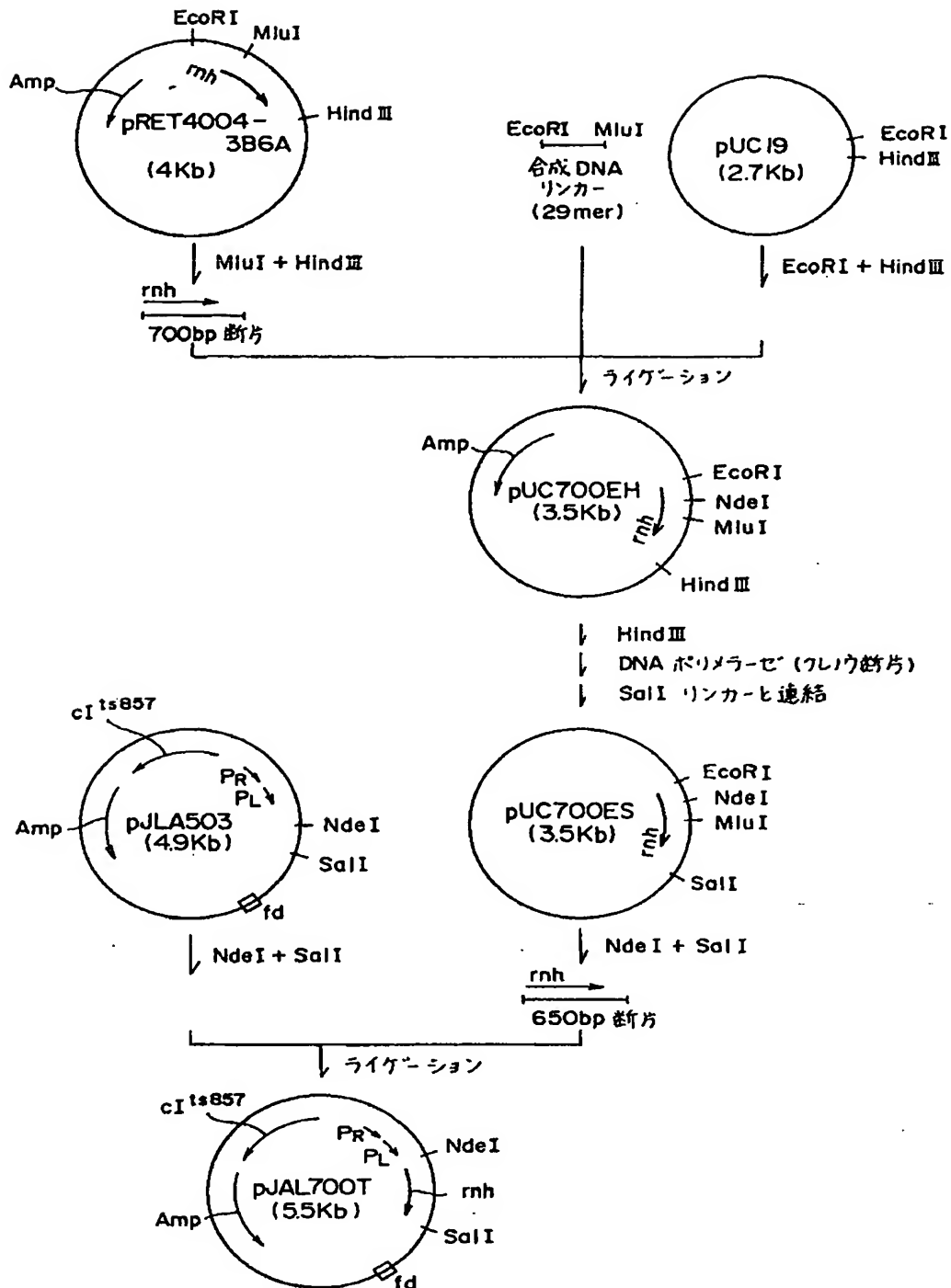
GCATAAAAGCGTTATAATCGGGCCATGCTGGAAACCGCCCTCGGCCCGGAGGACCGGAAAGCCCCAGC  
 Ala

【第3図】

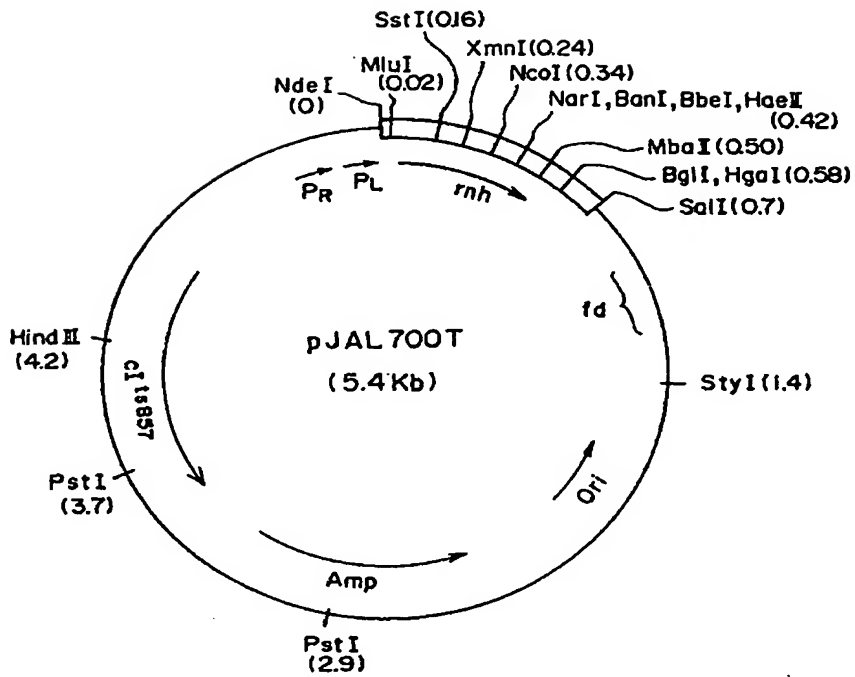
M N P S P R K R V...

AATTGCATATGAATCCATCACCTAGAAAA  
 CTTATACCTTAGGTAGTGGATCTTTTGGCG  
 EcoRI NdeI MluI

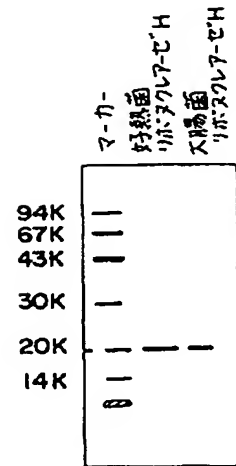
【第2図】



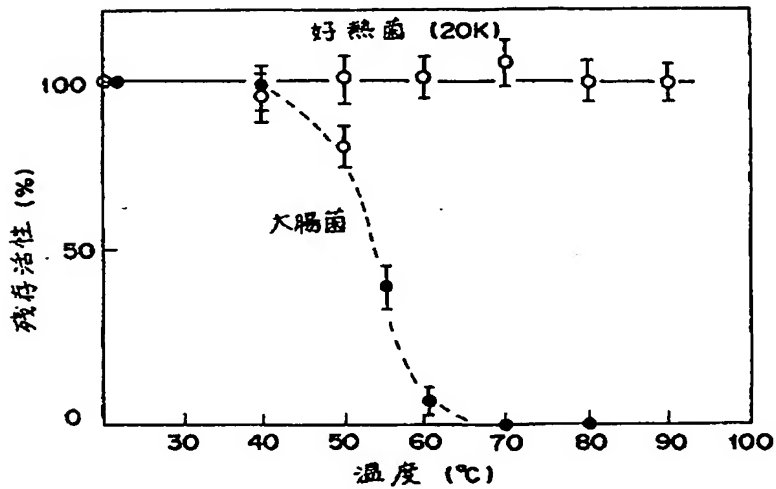
【第4図】



【第5図】



【第6図】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
 (C12N 9/22  
 C12R 1:19)

識別記号 片内整理番号

F I  
 (C12N 9/22  
 C12R 1:19)

技術表示箇所